昆虫学报 *Acta Entomologica Sinica*，June 2008，51（6）：586－594　ISSN 0454-6296

蜂毒溶血肽对鸡红细胞及膜的生化作用

赵亚华[1]，张微[1]，李日清[1]，钟杨生[2]，郑慧平[1]，林健荣[2]

（1. 华南农业大学生命科学学院，广州　510642；2. 华南农业大学动物科学学院，广州　510642）

摘要：本文采用荧光分光光度、薄层层析、原子吸收、荧光显微图像等多种生化技术，系统研究了蜂毒肽作用于鸡红细胞及膜的生化机理。结果表明 蜂毒肽影响红细胞膜上及胞内两种酶的功能。它抑制膜 Na^+-K^+-ATPase 活性，导致胞内外离子转运异常，K^+ 浓度失衡 它也抑制细胞内葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活性，其正电区域干扰胞内带负电小分子的作用，影响红细胞正常代谢。蜂毒肽干扰膜中阴离子通道的转运功能，使细胞渗透压改变，引起膨胀而溶血。蜂毒肽对有核红细胞核内 DNA 没有作用，与其他抗微生物多肽作用的靶向不同。据此认为，抗菌蛋白类抗生素对细菌作用的生化机理与传统抗生素不同，这是细菌对其不易产生耐药性的重要原因。

关键词：蜂毒溶血肽；生化机理；Na^+-K^+-ATPase；葡萄糖-6-磷酸脱氢酶；阴离子通道

中图分类号：Q786　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296（2008）06-0586-09

Biochemical effects of melittin on chicken red blood cell and membrane

ZHAO Ya-Hua[1], ZHANG Wei[1], LI Ri-Qing[1], ZHONG Yang-Sheng[2], ZHENG Hui-Ping[1], LIN Jian-Rong[2] (1. College of Life Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The biochemical mechanism of the effects of melittin on red blood cells (RBC) and the cell membrane was studied. The results indicated that melittin influenced the function of two enzymes which are located respectively on the RBC membrane and in cytoplasm. It inhibited the activity of Na^+-K^+-ATPase, leading to the abnormity of transportation of the ions inside and outside the cell and the unbalance of K^+ concentration; and it also inhibited the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) by using its electropositive domain to interfere with the eletronagative small molecules in the cell, and thus influenced the normal metabolism of RBC. Melittin interfered with the function of the anion channel on the membrane; therefore, the osmotic pressure of the cell changed, causing the swelling and hemolysis of RBC. Melittin did not have any effect on the DNA in the nucleus of an RBC whose nucleus exists, displaying a different targeting mechanism with other antimicrobial peptides. It is so concluded that the biochemical mechanism of the antibacterial action of antibiotics of antibacterial protein type is different from that of traditional antibiotics, which may be the main reason why the former one seldom causes the drug resistance in bacteria.

Key words: Melittin; biochemical mechanism; Na^+-K^+-ATPase; glucose-6-phosphate dehydrogenase; anion channel

蜂毒肽是目前人类已知最强的抗菌消炎活性物质之一，属于一种典型的抗微生物多肽，对 20 多种 G^+ 和 G^- 细菌等病原微生物的生长繁殖有强烈的抑制作用，并且作为一种天然生物药物具有多种良好的细胞生物学功能（李朝和黄培堂，2004；王关林和邢卓，2005；赵亚华等，2007）。然而蜂毒肽能够溶解红细胞（RBC），在 1 μg/mL 浓度时就能使红细胞溶血（Pérez-Payá *et al*.，1994；Vogel and Jahnig，2000），这极大地限制了其在医药领域的应用。由于蜂毒肽的药用功能很强，是一种不可多得的天然生物活性物质，引起了许多学者的关注，已成为一种研究抗微生物多肽类物质结构与功能的模式肽（Bechinger，

基金项目：国家自然科学基金项目（30770317）

作者简介：赵亚华，女，1955 年生，浙江宁波人，博士，教授，主要从事肽类分子作用机理研究，E-mail：zhaoyahua@126.com；Tel.：+86-20-85280186；Fax：+86-20-85282180

收稿日期 Received：2007-08-20；**接受日期** Accepted：2008-05-09

1997；Doltchinkova *et al*.，2003；Liu *et al*.，2005；Andersson *et al*.，2007）。以往鲜见关于蜂毒肽对红细胞及膜作用生化代谢机理方面的报道（除少量对膜脂分析外）（Gomara *et al*.，2003；Daniel *et al*.，2005）。本实验从生化作用角度，研究蜂毒肽对红细胞及膜作用过程中红细胞渗透性变化，Na^+-K^+-ATPase 活性变化，K^+ 渗漏，葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活性变化，蜂毒肽对有核红细胞核内 DNA 的作用，阴离子通道能力检测，以及细胞膜脂分析等，通过实验确定蜂毒肽与红细胞膜作用可能的靶点及溶血的生化机理，为今后深入研究这类天然药物毒性的分子机理提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　供试材料与试剂

新鲜鸡血红细胞、蜂毒肽（纯度≥97%，HPLC，Synthetic）、NADP、氧化型谷胱甘肽、ATP、SPQ、Ouabain、G-6-P 等主要试剂购自 Sigma 公司；其余试剂均为进口或国产分析纯。

1.2　制备红细胞与红细胞膜

参照张龙翔等（1997）的方法制备红细胞悬浮液和红细胞膜。制备的膜样品悬浮在生理盐水中，于 -20℃保存备用。

1.3　红细胞孵育渗透脆性测试

参照徐文琳等（2003）的方法并略有改进。按表 1 制备不同浓度的氯化钠-磷酸缓冲液。

各管分别加入 50 μL 新鲜抗凝鸡血，混匀，于 20℃ 放置 30 min，摇匀，3 000 r/min，离心 10 min 取上清。在 540 nm 波长下，以氯化钠-磷酸缓冲液做对照，测定各管光吸收值。再另取 13 支管，分别加入 50 μL 新鲜鸡血，再依次加入 50 μL 25 μmol/L 蜂毒肽使其终浓度为 0.25 μmol/L，之后处理同上，测定各管光吸收值。测试 3 次，取平均值。

表 1　不同浓度氯化钠-磷酸缓冲液的制备

Table 1　Preparation of different concentrations of NaCl-PBS buffers

组分 Components	试管编号 Test tube no.												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
9 g/L 氯化钠-磷酸缓冲液 NaCl-PBS buffers (mL)	4.25	3.75	3.50	3.25	3.00	2.75	2.50	2.25	2.00	1.75	1.50	1.00	0.50
双蒸水 ddH_2O (mL)	0.75	1.25	1.50	1.75	2.00	2.25	2.50	2.75	3.00	3.25	3.50	4.00	4.50
氯化钠 NaCl (mmol/L)	145.3	128.3	119.7	111.1	102.6	94.1	85.5	77.8	64.8	59.8	51.3	34.2	17.1

1.4　Na^+-K^+-ATPase 活性的测定

按 1.2 的方法制备红细胞膜。用 Bradford（1976）法测定的膜蛋白含量约为 900 μg/mL。酶反应液内含 NaCl 6.0×10^{-2} mol/L，KCl 1.0×10^{-2} mol/L，pH7.4 Tris-HCl 1.5×10^{-3} mol/L，$MgCl_2$ 1.5×10^{-3} mol/L，ATP-Na_2 1.0×10^{-2} mol/L；乌本苷溶液 1.0×10^{-3} mol/L；定磷试剂：2.5%钼酸铵：17%硫酸：10%抗坏血酸：ddH_2O = 1∶1∶1∶2；EDTA 2.5×10^{-4} mol/L。

酶活力测定参照 Shorina 等（2004）的方法并略有改进。设置 2 组反应：A 组测试经蜂毒肽处理后红细胞膜 Na^+-K^+-ATPase 活性。B 组测试正常红细胞膜 Na^+-K^+-ATPase 活性；在两组反应管中分别依次加入酶反应液和制备的膜溶液；第 1 组加入 1.0×10^{-3} mol/L 乌本苷 0.15 mL，第 2 组加入 0.15 mL ddH_2O；37℃温浴 1 h，以预冷的 15% TCA 终止反应；各管加入定磷试剂 2 mL，56℃水浴 10 min，冷却后测定 OD_{660} 光吸收值。以两组反应检测的吸光值差作为红细胞膜 Na^+-K^+-ATPase 相对活力[μmol/L Pi/(g·h)]。测试 3 次，取平均值。

1.5　原子吸收法测定 K^+ 渗漏

取在 1.2 中制备的 5%红细胞悬液，加入不同浓度的蜂毒肽，在 Z-5300 型原子吸收分光光度计上，测定在 0～40 min 内蜂毒肽处理前后的细胞内外 K^+ 离子渗漏。测试 3 次，取平均值。

1.6　葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活性的测定

参照朱文斌等（2005）的方法做部分改进。在底物葡萄糖-6-磷酸（G-6-P）和辅酶 NADP 存在下，葡萄糖-6-磷酸脱氢酶（G-6-PD）能够将 NADP 还原成 NADPH，同时生成 6-磷酸葡萄糖酸。NADPH 在 340 nm 波长下有最大吸收。在 HITACHI-F4500 型荧光分光光度计上连续观察单位时间内 NADPH 发出荧光的强度，测定 NADP 被还原为 NADPH 的速率。因 NADPH 生成量与 G-6-PD 活性成正相关，由此可换算出 G-6-PD 的活力。以是否加入蜂毒肽的反应中 NADPH 生成量差值换算相对酶活力。测试 3 次，取平均值。

反应液内含 Tris-HCl（pH8.0）0.1 mol/L，EDTA 0.5 mmol/L，$MgCl_2$ 0.1 mmol/L，NADP 0.2 mmol/L，G-

6-P 0.6 mmol/L，1∶20 红细胞悬液 40 μL，加 ddH_2O 至总体积 2 mL；25 μmol/L 蜂毒肽。

1.7 单细胞凝胶电泳（SCGE）法检测蜂毒肽对有核红细胞核内 DNA 的作用

参照肖琳等（2005）的方法并作部分改进。按 1.2 的方法制备并配制 1.5%的红细胞悬液；碱性裂解液内含 2.5 mol/L NaCl，100 mmol/L Na_2EDTA，100 mmol/L Tris-HCl，1.0%十二烷基肌氨酸钠（pH10），用前加入 1.0% Triton X-100，10% DMSO；25 μmol/L 蜂毒肽；用 PBS 配制正常熔点和低熔点的 0.75%琼脂糖；电泳液内含 1 mmol/L EDTA，300 mmol/L NaOH（pH > 13）；用 ddH_2O 配制 5 μg/mL EB 染色液。

自制微型电泳槽，按以下操作：取 1 mL 5% RBC 悬液，分别加入不同浓度蜂毒肽，37℃孵育；铺胶：在下层倒入 0.75%正常熔点琼脂糖，用盖玻片覆盖，4℃放置 10 min。取下盖玻片，在低熔点琼脂糖中分别加入正常 RBC 悬液和经蜂毒肽处理的 RBC 悬液，上层倒入 0.75%低熔点琼脂糖与红细胞悬液混合物，用盖玻片覆盖，4℃下放置 10 min；待上下层胶全部凝结，取下盖玻片，置于裂解液中，4℃下裂解 1.5 h，将凝胶置于电泳液中，4℃下浸泡 20 min；设置电压 20 V，电泳 20 min. 将凝胶置于中和缓冲液中和。EB 染色 1 min，冲洗干净。选择 515 ~ 560 nm 激发光波长，荧光显微镜下观察，照相。实验设 3 次重复。

1.8 带 3 蛋白阴离子通道转运 HCO_3^-/Cl^- 能力的荧光检测

参照田利峰等（2004）的方法并作部分改进。配制溶液Ⅰ，Ⅱ，Ⅲ；用 ddH_2O 配制 6-甲基-3 磺丙基-1 喹啉-水化物（SPQ）；用 ddH_2O 配制 25 μmol/L 蜂毒肽。

取按 1.2 的方法制备并配制的 1.5% RBC 悬液，用 PBS 洗 4 次，于 4℃，3 000 r/min，离心 15 min，取 RBC 积压液备用。以 1∶9 的比例将 RBC 积压液与溶液Ⅰ轻微混合，悬浮细胞，加入 SPQ 至终浓度为 2.85 mmol/L。37℃下避光孵育 1 h，1 000 r/min，离心，弃上清。用等体积溶液Ⅱ重悬积压液，1 000 r/min，离心，弃上清。取 12.5 μL RBC 积压液，加入 25 μmol/L 蜂毒肽和溶液Ⅲ，室温静置 5 min。设定激发波长 320 nm，发射波长 445 nm，用 F-4500 型荧光分光光度计测定荧光强度，每隔 5 min 读数一次，记录。以未加入蜂毒肽作为对照组测试。重复 3 次实验。

1.9 蜂毒肽与红细胞膜脂质作用的分析

参照张龙翔等（1997）的方法，用薄层层析法分析蜂毒肽作用于 RBC 膜后的膜脂迁移率。取按 1.2 方法制备并配制的 1.5%红细胞悬液和制备的膜样品。配制 25 μmol/L 蜂毒肽。用内含 50 mL $CHCl_3$，25 mL CH_3OH 的提取液提取红细胞膜脂。

薄层层析：固定液：25 mL $CHCl_3$ ∶ 25 mL CH_3OH = 1∶1；展层剂：量取 90 mL $CHCl_3$，54 mL CH_3OH，5.5 mL $NH_3 \cdot H_2O$，5.5 mL H_2O 混匀；制备薄层板：以层析用硅胶∶ddH_2O = 1∶3 混合，研磨均匀，制备厚度为 0.2 ~ 0.3 mm 的薄层板，室温下晾干，110℃活化 1 h 后备用。各样品按 1∶1 比例加入固定液上样。展层 1 h。固态碘显色 48 h 以上，升华的碘遇到磷脂后发生加成反应，使磷脂斑点呈现黄色或棕黄色，取重复性好且显色清晰的图片立即拍照。实验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 蜂毒肽对红细胞在孵育过程中渗透脆性变化的影响

以新鲜鸡血为对照，在不同氯化钠-磷酸缓冲液浓度下检测蜂毒肽处理的红细胞孵育渗透脆性。血红蛋白在 OD_{540} 处有最大吸收峰，通过比较光吸收值，得到处理前后红细胞膜的渗透脆性变化如图 1。与对照相比，当蜂毒肽与培养的红细胞共孵育后，光吸收值随氯化钠-磷酸缓冲液浓度逐渐降低而上升，在缓冲液中氧化钠浓度低至 77.8 mmol/L 时开始明显上升，之后逐渐大幅上升。说明蜂毒肽在低渗缓冲液中能使红细胞膜渗透脆性增强，血红蛋白大量外渗。推测蜂毒肽可能作用于膜上的磷脂及蛋白等，导致膜结构变化，渗透脆性增强。

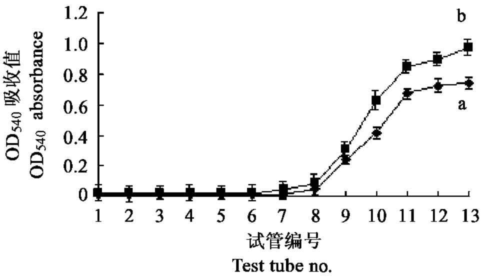

图 1 蜂毒肽作用下的红细胞在孵育过程中渗透脆性变化

Fig. 1 Change of the osmotic fragility in the red blood cell incubation process under the influence by melittin

a 正常血液溶血 Normal blood hemolysis；b 加入蜂毒肽后血液溶血 Blood hemolysis by melittin.

2.2　蜂毒肽与红细胞膜 Na^+-K^+-ATPase 的作用关系研究

蜂毒肽对 RBC 膜 Na^+-K^+-ATPase 活性影响结果见表 2。

表 2　Pi 生成速率与酶活性测试结果

Table 2　Test result of the Pi creating velocity and enzyme activity mensuration

测试组 Test group	Pi 生成速率 Pi generating rate [μmol/L Pi/(g·h)]	相对酶活力 Relative enzyme activity [μmol/L Pi/(g·h)]
A	2.08	3.78
B	1.99	3.69

经计算，A 组比对照 B 组活性下降了 46.1%，证明蜂毒肽作用于红细胞后，能使膜质 Na^+-K^+-ATPase 结构受到较大影响，导致酶活性大幅下降。位于细胞膜上的 Na^+-K^+-ATPase 在正常状态下具有特定分子构象。酶在质膜外侧具有高亲和力 K^+ 结合部位，但 K^+ 部位同时也是乌本苷结合部位。乌本苷作为 Na^+-K^+-ATPase 专一性抑制剂，能从膜外侧抑制膜上酶的活性。推测在蜂毒肽作用于质膜过程中，对酶在膜上的拓扑构象有较大影响，导致膜上的离子转运异常，细胞内外离子浓度失衡，细胞渗透压改变而间接引起红细胞溶血。

通过测试蜂毒肽作用于质膜随时间的活性变化发现，经蜂毒肽处理的质膜，Na^+-K^+-ATPase 相对活性随时间延长而逐渐降低。在 0 ~ 15 min 下降平缓，15 ~ 20 min 的时段内明显下降，20 min 后又趋缓。在 15 ~ 20 min 时段酶活性明显下降的现象正好与蜂毒肽插膜时段相吻合，表明蜂毒肽插入质膜对 Na^+-K^+-ATPase 活性影响的程度具有一定时段性（图 2）。

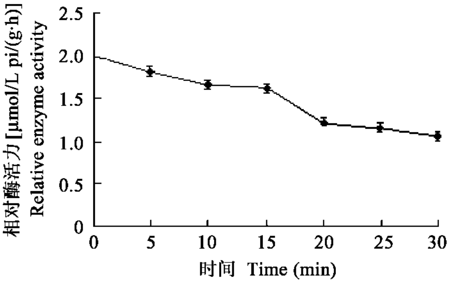

图 2　Na^+-K^+-ATPase 酶活性随蜂毒肽作用变化曲线

Fig. 2　The changing curve of Na^+-K^+-ATPase activity under the influence by melittin

2.3　原子吸收法测定 K^+ 渗漏

原子吸收法测定蜂毒肽处理前后细胞内外 K^+ 离子渗漏的结果如图 3。随着蜂毒肽浓度增加及溶血时间延长，细胞内 K^+ 逐渐渗漏到胞外，导致细胞渗透压改变，使红细胞破裂溶血。这是由于在蜂毒肽作用下，跨膜的 Na^+-K^+-ATP 酶活性下降，膜上离子通道的运输功能减弱甚至丧失，胞内外原有的离子浓度失衡所致。

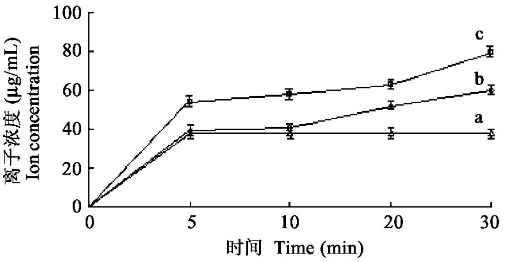

图 3　不同浓度蜂毒肽作用下红细胞内外 K^+ 渗漏变化曲线

Fig. 3　The K^+ leakage curve inside and outside red blood cell under the influence of melittin of different concentrations

a：0 μg/mL 蜂毒肽 Melittin；b：3 μg/mL 蜂毒肽 Melittin；c：6 μg/mL 蜂毒肽 Melittin.

2.4　蜂毒肽对红细胞中葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活性的影响

图 4 是在单位时间内 G-6-PD 催化 NADP 还原为 NADPH 的速率曲线图。与对照相比，酶活性受到持续较小的抑制，NADPH 生成速率上升缓慢，将 G-

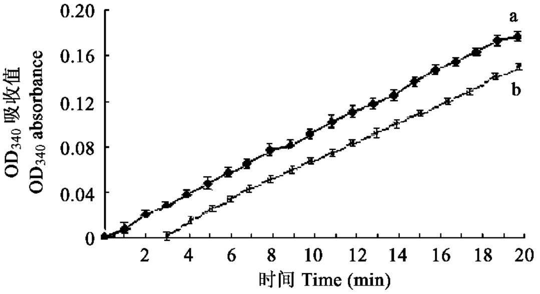

图 4　G-6-P D 催化生成 NADPH 速率随时间变化

Fig. 4　The speed-time change of G-6-P D-catalysed NADPH production

a：以 G-6-P 启动反应（无蜂毒肽）Initiated by G-6-P (without melittin)；b：蜂毒肽与 G-6-P 混合后启动反应 Initiated by G-6-P mixed with melittin.

6-P 与蜂毒肽混合后再加入反应液时，酶活性滞后约 3 min 被检出，推测蜂毒肽先是与 G-6-P 发生了内在相互作用，结果使酶无底物催化，不生成 NADPH，约 3 min 后 NADPH 开始生成，反应速率与对照基本一致。

设置由 NADP 与蜂毒肽混合后反应的结果如图 5。总反应趋势与前面的一致，但活性检出滞后时间约 2 min。推测蜂毒肽与底物 G-6-P 及辅酶 NADP 的作用机理相似，只是速度有差异。

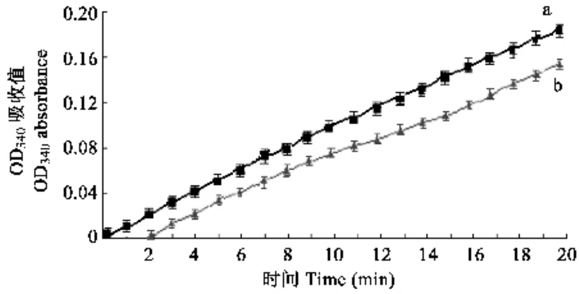

图 5　G-6-PD 催化 NADPH 生成速率随时间的变化

Fig. 5　The speed-time change of G-6-P D-catalysed NADPH production

a：以 G-6-P 启动反应（无蜂毒肽）Initiated by G-6-P（without melittin）；b：蜂毒肽与 NADP 混合后启动反应 Initiated by NADP mixed with melittin.

设置先用蜂毒肽预处理红细胞悬液（含 G-6-PD）之后再加入反应液进行酶促反应，与不经蜂毒肽预处理，而在反应开始时加入蜂毒肽的反应，在两种条件下的酶活性无明显差异（图 6），说明蜂毒肽不影响 G-6-PD 酶分子本身的结构，而是通过与其底物及辅酶的作用抑制酶活性的。

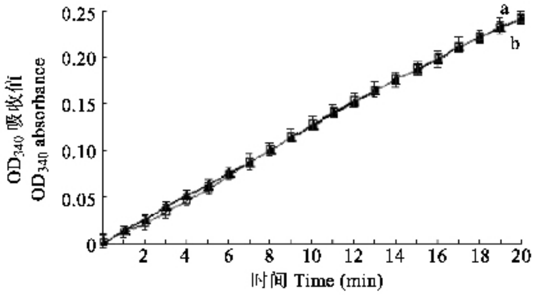

图 6　蜂毒肽对红细胞 G-6-PD 的影响

Fig. 6　Effects of RBC G-6-PD reacted by melittin

a：蜂毒肽处理 RBC 悬液后启动反应 Melittin is added in the RBC suspended solution before the reaction begins；b：在启动反应时加入蜂毒肽 Melittin is added when the reaction begins.

2.5　蜂毒肽对红细胞核内 DNA 的作用

蜂毒肽与 RBC 悬液共孵育后，荧光显微镜图像用软件 CASP（Comet Assay Soft Project）分析，结果见图 7。经不同浓度蜂毒肽处理的 RBC 核内 DNA 未发生解螺旋和链断裂等现象，所有图像的 CASP 分析结果表现为球形。如果核 DNA 受到损伤，则其断裂的片段将从细胞内释放出来，这些小片段 DNA 在电泳过程中离开细胞核向阳极移动，形成彗星状的图像而非球形图像。经 CASP 分析，与正常红细胞核 DNA 的 SCGE 分析本底值 0.003% 比较，经 50 μL 蜂毒肽处理后的 RBC 核 DNA 损伤值为 1.124%；100 μL 处理的损伤值为 0.682%；200 μL 处理的损伤值为 2.741%，均 < 5%（属该方法设定的可忽略值范围），表明蜂毒肽处理后的核 DNA 基本未受损伤。

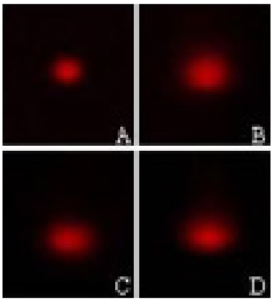

图 7　SCGE 分析蜂毒肽对核 DNA 的作用

Fig. 7　SCGE analysis of the reaction of melittin on nuclear DNA

A：正常 RBC Nnormal RBC；B：50 μL 蜂毒肽处理 RBC RBC treated by 50 μL melittin；C：100 μL 蜂毒肽处理 RBC RBC treated by 100 μL melittin；D：200 μL 蜂毒肽处理 RBC RBC treated by 200 μL melittin.

2.6　带 3 蛋白阴离子通道转运 HCO_3^-/Cl^- 能力的荧光检测

带 3 蛋白阴离子通道转运 HCO_3^-/Cl^- 能力的荧光检测结果见图 8。氯离子对 SPQ 发射的荧光有淬灭作用，由荧光强度相对变化曲线可见，在 RBC 悬液中刚加入蜂毒肽时本底值为 1.79，5 min 时蜂毒肽处理的 RBC 荧光强度比未经处理的增加了 1.27 倍，之后随时间延长而缓慢增加；在 10 min 时增加了 1.01 倍，15 min时增加了 0.94 倍，到 35 min 时增加了 0.68 倍。细胞内荧光强度的上升反映了氯离子出胞作用缓慢增加，间接说明蜂毒肽处理后的 RBC 带 3 蛋白阴离子通道转运 HCO_3^-/Cl^- 能力增强。

2.7　蜂毒肽对红细胞膜脂质作用的薄层分析

蜂毒肽对 RBC 膜脂质作用的结果见图 9。b 迁移道为 Triton X-100 处理的细胞膜，显色斑点成较明

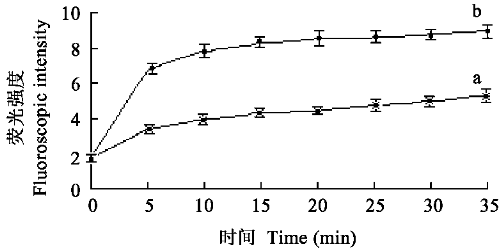

图8 带3蛋白阴离子通道转运 HCO_3^-/Cl^- 能力的荧光检测

Fig. 8 Fluoroscopic examination of the ability of Band 3 protein anion channel to transfer HCO_3^-/Cl^-

a：正常红细胞荧光强度 Normal fluorescence intensity of RBC；b：蜂毒肽加入红细胞的荧光强度 Fluorescence intensity of erythrocytes processed by melittin.

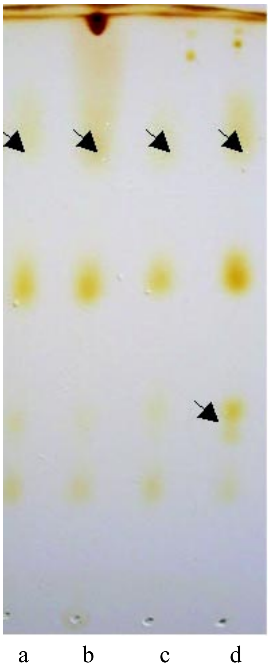

图9 蜂毒肽与红细胞膜脂作用的薄层分析

Fig. 9 Thin layer analysis of the membrane lipid reaction of melittin on RBC membrane

a：用低渗缓冲液处理的 RBC 膜脂 The RBC membrane lipid treated by low infiltration buffer；b：用 Triton X-100 处理的膜脂 The membrane lipid treated by Triton X-100；c 加蜂毒肽处理的膜脂 The membrane lipid treated by melittin；d 加入蜂毒肽处理红细胞悬浮液之后再提取的膜脂 The membrane lipid treated by melittin added in the RBC suspended solution.

显扫帚型，显示含多种长短链不同游离脂肪酸，Triton X-100（氚核）为一种非离子型表面活性剂，其分子中活泼氢原子的憎水性能使膜脂发生不同程度的降解；而在 a 和 c 迁移道中该位置显色很淡，说明无论是用低渗缓冲液还是蜂毒肽处理都只能使膜破裂，而降解释放游离脂肪酸的作用很小，推测蜂毒肽的溶血作用并非以直接降解膜脂为主；d 迁移道是蜂毒肽处理红细胞悬液后再提取的膜脂，下端箭头所指斑点是迁移较慢的脂肪酸，分析该斑点是经蜂毒肽的处理，激活了膜上磷脂酶，后者使膜上磷脂分子部分酯键断裂，释放相应的游离脂肪酸所致。同时，用蜂毒肽处理的红细胞悬液也能使少量膜脂类物质降解，释放不同脂肪酸。

3 讨论

渗透脆性试验能够检测细胞对低渗盐溶液的抵抗力。在 RBC 孵育过程中胞内葡萄糖等营养被消耗，ATP 减少，膜对阳离子的主动运输受阻，使 Na^+ 在胞内聚集而导致细胞膨胀，渗透脆性增加。RBC 膜表面的酶功能缺陷，如 Na^+-K^+-ATP 酶活性下降，导致 RBC 脆性升高。本研究证实正常 RBC 与蜂毒肽共育后，RBC 渗透脆性增加。这是因为膜结构改变所致。推测是蜂毒肽引起溶血原因之一。这与 Pratt 等（2005）的研究结果相似。

蜂毒肽具有膜活性，能插入磷脂双层膜中，作用于膜 Na^+-K^+-ATPase，影响酶发挥作用，同时 Na^+-K^+-ATPase 的离子转运活性也依赖于质膜的完整性（Hristova *et al*.，2001）。位于细胞膜上的 Na^+-K^+-ATPase 具有特定的拓扑构象，属低聚体跨膜蛋白（徐文琳，2003；Shorina *et al*.，2004）。其作用是作为一种载体蛋白，对质膜内外的离子浓度、膜电势及细胞内外渗透压平衡的调节，维持胞内外的 K^+、Na^+ 离子浓度（Raynor *et al*.，1991；谭齐贤和张树平，2005）。蜂毒肽在作用于质膜过程中，对酶在膜上的分子构象有较大影响，跨膜的 Na^+-K^+-ATP 酶活性下降，导致膜上离子转运异常，细胞内 K^+ 外渗，细胞内外离子浓度失衡，渗透压改变而引起溶血。蜂毒肽插膜在 15 ~ 20 min 的时段酶活性明显下降的现象与插膜时段同步（Gomara *et al*.，2003），其原因可能由于这种多肽分子作用于膜的方式主要是先向膜靠近，继而附着或插入膜中，通过多肽与膜两者间大分子互作，扰乱了原来定向排列在膜上酶分子的特定构象，从而影响其活性发挥。由于这种大分子间的运动过程缓慢，导致在 0 ~ 15 min 酶活性缓慢下降；而在 15 ~ 20 min 的时段内酶活性明显下降的原因可能是经历了前面缓慢的分子运动后，酶分子构象在这一短时内发生较大改变，不能有效催化无机磷生成。在 20 min 之后，酶活性继续平缓下降，说明此时的分子构象不利于催化反应，但又未完全失

去活性，这一结果符合生物大分子相互作用的理论（Nelson and Cox，2004；Kulagina *et al*.，2007）。

蜂毒肽对 G-6-PD 活性的影响主要是通过作用于 G-6-P 和辅酶 NADP，使酶促反应受到缓慢抑制，而非直接作用于酶分子本身。G-6-P 和 NADP 都是带负电荷的小分子，蜂毒肽则是带正电荷的大分子，这些大小分子间的相互正负电荷吸引，及蜂毒肽分子本身的状态（单体/四聚体）影响 G-6-PD 的活性。在 G-6-PD 分子上，分别有底物和辅酶的结合位点，辅酶结合位点与 NADP 亲和作用很强，低浓度的 NADP 即可发生反应，其浓度变化对 G-6-PD 活性影响不明显；而底物结合位点对 G-6-P 亲和性较弱，降低 G-6-P 浓度时 G-6-PD 活性下降显著。当 NADP 为 40 μmol/L 时，将 G-6-P 浓度从 600 μmol/L 减少至 250 μmol/L，G-6-PD 活性则下降 53.6%（Nelson and Cox，2004）。红细胞内环境中 NADP 浓度很低，约 1 μmol/L，NADPH 的稳定浓度为 65 μmol/L，［NADP］/［NADPH］= 1/71，G-6-P 浓度为 83 μmol/L（Ögüs and Ozer，1999），这种比例维持红细胞的正常代谢。当带正电荷蜂毒肽进入细胞，以静电作用吸引 G-6-P，通过降低介质中 G-6-P 浓度而影响 G-6-PD 作用；同时也以近乎相同的作用方式与 NADP 作用，干扰正常的细胞代谢。磷酸戊糖代谢的主要作用是产生 NADPH，用于长链脂肪酸、固醇、四氢叶酸等的合成。蜂毒肽对 NADP 的作用能够阻碍红细胞的 PPP，同时干扰细胞内氧还系统，致使细胞及其膜易受到 H_2O_2 等氧化性分子及自由基的攻击而受损，从而间接诱发溶血，这些都是导致红细胞溶血的生化原因。

通常研究蛋白质或肽与 DNA 相互作用多用凝胶阻滞实验技术，但此法需要用核素物质等标记 DNA 才能进行。SCGE 在单细胞水平上检测有核细胞 DNA 损伤和修复（肖琳等，2005）。本实验结果显示，即使使用 200 μL 浓度为 25 μmol/L 蜂毒肽处理，红细胞也未发生 DNA 损伤等现象，证明溶血过程与核 DNA 无关。有研究发现，一种巨大曲霉分泌的抗菌蛋白 AFP，通过用 Alexa-568 标记后处理稻瘟病菌，AFP 能进入真菌细胞并与核酸结合而抑制稻瘟病菌生长（Moreno *et al*.，2006）。可能蜂毒肽与 AFP 作用机理不同。

用蜂毒肽处理细胞质膜与处理细胞悬液所获结果表明，蜂毒肽作用于单纯的细胞质膜时不能降解膜中的脂类物质，而作用于悬浮的红细胞时，则能降解膜中的脂类物质，这是由于蜂毒肽激活了红细胞膜中或胞内相应的磷脂酶（如磷脂酶 A_1 和 A_2），后者能使 RBC 膜的卵磷脂（PC）或鞘磷脂（SM）分子中第 1 或第 2 位酯键断裂，卵磷脂脱去极性较高的脂肪酸，生成溶血卵磷脂等，这与前人的研究结果（Koumanov *et al*.，2003；Constantinesu and Lafleur，2004）相似。证明蜂毒肽作用于 RBC 膜引起溶血，主要是间接激活膜磷脂酶降解膜磷脂引起的。这是蜂毒肽引起溶血的另一重要原因。带 3 蛋白由 54 kDa 跨膜段和 43 kDa 胞质段（Katalin and Ludmila，1996；田利峰等，2004）组成。主要负责细胞内外 Cl^- 和 HCO_3^- 间跨膜交换，调节胞内 pH 值。Cl^- 能淬灭 SPQ 发射的荧光。蜂毒肽能使膜上阴离子通道转运能力加强，Cl^- 出胞加快，荧光吸收上升，造成胞内外离子浓度失衡，细胞渗透压改变，引起溶血（Raghuraman and Chattopadhyay，2006）。本实验室先前研究验证了蜂毒肽与 RBC 作用后，膜蛋白 Band-2 的一个亚型被裂解，Band-3 被降解为两个碎片，在 Band-4 蛋白附近产生两条新带，对照标准蛋白分子量得到这两条区带分子量在 45 kDa 左右，推测是 Band-3 蛋白降解的两个片段，使 RBC 膜微环境扰乱，膜正常功能受阻。导致葡萄糖及阴离子转运异常。进一步使蜂毒肽分子间接激活了膜或胞质中的蛋白水解酶，后者与位于膜内侧的 Band-2 蛋白结合，使 Band-2 蛋白的磷酸化作用和 Ca^{2+}-ATP 酶活性受到抑制，并影响 Band-2 蛋白膜收缩和膜骨架功能，从而影响整个膜脂的正常功能（Kanki *et al*.，2002）。蜂毒肽的两亲分子结构是其与膜结合，以及与膜蛋白形成跨膜螺旋的典型特征（Terwilliger and Eisenberg，1982；Ladokhin and White，1999；Terra *et al*.，2007），而其溶血功能主要基于多肽的两亲性分子在红细胞膜上形成穿孔（Kourie and Shorthouse，2000；Belokoneva *et al*.，2004；Allende *et al*.，2005；Antonenko *et al*.，2005；Zelezetsky and Tossi，2006），释放细胞内含物，裂解红细胞而溶血。

综上所述我们认为，蜂毒肽的抗菌机理与通过阻断细菌的大分子生物合成等过程而发挥作用的传统抗生素抗菌机理有所不同，这是细菌对抗菌蛋白类物质不易产生耐药性的原因之一。同时说明，尽管蜂毒肽有一定的溶血性，但无论是传统的还是现代医药业，都始终不能放弃应用蜂毒肽作为药物治疗的重要意义。

参考文献（References）

Allende D，Simon SA，McIntosh TJ，2005. Melittin-induced bilayer leakage

depends on lipid material properties：evidence for toroidal pores. *Biophys. J.*，88(3)：1 828 – 1 837.

Andersson A，Biverstähl H，Nordin J，Danielsson J，Lindahl E，Mäler L，2007. The membrane-induced structure of melittin is correlated with the fluidity of the lipids. *Biochimica et Biophysica ActaBiomembranes*，1 768：115 – 121.

Antonenko YN，Stoilova TB，Kovalchuk SI，Egorova NS，Pashkovskaya AA，Sobko AA，Kotova EA，Sychev SV，Surovoy AY，2005. Large unselective pore in lipid bilayer membrane formed by positively charged peptides containing a sequence of gramicidin A. *FEBS Letters*，579：247 – 252.

Bechinger B，1997. Structure and functions of channel-forming peptides：magainins，cecropins，melittin and alamethicin. *The Journal of Membrane Biology*，156：197 – 211.

Belokoneva OS，Satake H，Mal′tseva EL，Pal′mina NP，Villegas E，Nakajima T，Corzo G，2004. Pore formation of phospholipid membranes by the action of two hemolytic arachnid peptides of different size. *Biochimica et Biophysica Acta*，1 664：182 – 188.

Bradford MM，1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*，72：248 – 254.

Constantinescu I，Lafleur M，2004. Influence of the lipid composition on the kinetics of concerted insertion and folding of melittin in bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes*，1 667：26 – 37.

Daniel A，Simon SA，Thomas JM，2005. Melittin-induced bilayer leakage depends on lipid material properties evidence for toroidal pores. *Biophysical Journal*，88(3)：1 828 – 1 837.

Doltchinkova V，Georgieva K，Traytcheva N，Slavov C，Mishev K，2003. Melittin-induced changes in thylakoid membranes：particle electrophoresis and light scattering study. *Biophysical Chemistry*，109(204)：387 – 397.

Gomara MJ，Nir S，Nieva JL，2003. Effects of sphingomyelin on melittin pore formation. *Biochimica Biophysica Acta*，1 612：83 – 89.

Hristova K，Dempsey CE，White SH，2001. Structure，location，and lipid perturbations of melittin at the membrane interface. *Biophysical Journal*，80(2)：801 – 811.

Kanki T，Sakaguchi M，Kitamura A，Sato T，Mihara K，Hamasaki N，2002. The tenth membrane region of band 3 is initially exposed to the luminal side of the endoplasmic reticulum and then integrated into a partially folded band 3 intermediate. *Biochemistry*，41(47)：13 973 – 13 981.

Katalin B，Ludmila VS，1996. Tracer kinetic studies of melittin action on RBC membranes. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*，40：9 – 13.

Koumanov K，Momchilova A，Wolf C，2003. Bimodal regulatory effect of melittin and phospholipase A2-activating protein on human type Ⅱ secretory phospholipase A2. *Cell Biol. Int.*，27(10)：871 – 877.

Kourie JI，Shorthouse AA，2000. Properties of cytotoxic peptide-formed ion channels. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*，278：C1 063 – C1 087.

Kulagina NV，Shaffer KM，Ligler FS，Taitt CR，2007. Antimicrobial peptides as new recognition molecules for screening challenging species. *Sensors and Actuators B：Chemical*，121：150 – 157.

Ladokhin AS，White SH，1999. Folding of amphipathic α-helices on membranes：Energetics of helix formation by melittin. *J. Mol. Biol.*，285：1 363 – 1 369.

Li C，Huang PT，2004. A new generation of antibiotic：The advance on investigation of antimicrobial peptides. *World Notes on Antibiotics*，25(3)：109 – 112. ［**李朝，黄培堂**，2004. **新一代抗生素：抗菌肽相关研究进展**. **国外医药：抗生素分册**，25(3)：109 – 112］

Liu P，Huang XH，Zhou RH，Berne BJ，2005. Observation of a dewetting transition in the collapse of the melittin tetramer. *Nature*，437：159 – 162.

Moreno AB，Martínez del Pozo A，Borja M，San Segundo B，2006. Biotechnologically relevant enzymes and proteins：Antifungal mechanism of the *Aspergillus giganteus* AFP against the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Applied Microbiology and Biotechnology*，72(5)：883 – 895.

Nelson DL，Cox MM，2004. Principles of Biochemistry. 4th ed. Worth Publishers，New York. 256 – 320.

Ögüs H，Özer N，1999. On the kinetics of human erythrocyte glutathione disulfide reductase：does the enzyme really play ‘ping-pong’. *Journal of Biology*，23：143 – 151.

Pérez-Payú PE，Houghten RA，Blondelle SE，1994. Determination of the secondary structure of selected melittin analogues with different haemolytic activities. *Biochem. J.*，299：587 – 591.

Pratt JP，Ravnic DJ，Huss HT，Jiang X，Orozco1 BS，Mentzer SJ，2005. Melittin-induced membrane permeability：A nonosmotic mechanism processes appear to occur independently. *Biochimica et Biophysica Acta*，1 661：188 – 195.

Raghuraman H，Chattopadhyay A，2006. Effect of ionic strength on folding and aggregation of the hemolytic peptide melittin in solution. *Biopolymers*，83(2)：111 – 121.

Raynor RL，Zheng B，Kuo JF，1991. Membrane interactions of amphiphilic polypeptides mastoparan，mellitin，polymyxin B，and cardiotoxin. Differential inhibition of protein kinase C，Ca^{2+}/calmodulin dependent protein kinase II and synaptosomal membrane Na^+，K^+-ATPase，and Na^+ pump and differentiation of HL60 cells. *J. Biol. Chem.*，266(5)：2 753 – 2 758.

Shorina EA，Dolgova NV，Rubtsov AM，Storey KB，Lopina OD，2004. Melittin induces both time-dependent aggregation and inhibition of Na，K-ATPase from duck salt glands however these two processes appear to occur independently. *Biochimica et Biophysica Acta*，1 661：188 – 195.

Tan QX，Zhang SP，2005. Clinical Hematology and Blood Detection. 3rd ed. People's Medical Publishing House，Beijing. 120 – 142. ［**谭齐贤，张树平**，2005. **临床血液学和血液检测**. **第三版**. **北京：人民卫生出版社**. 120 – 142］

Terwilliger CT，Eisenberg D，1982. The Structure of Melittin. *The Journal of Biological Chemistry*，257：6 016 – 6 022.

Terra RM，Guimarães JA，Verli H，2007. Structural and functional behavior of biologically active monomeric melittin. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*，25：767 – 772.

Tian LF，Xi YH，Bai SZ，2004. Effect of overexpression of p16 on onion exchange function of anion exchanger 1 at HeLa cell lines. *Chinese Journal of Pathophysiology*，20(4)：518 – 522. ［**田利峰，席玉慧，白淑芝**，2004. p16 **蛋白过表达对哺乳动物细胞带** 3 **蛋白阴离子交**

换功能的影响. 中国病理生理杂志，20(4)：518 – 522]

Vogel H，Jähnig F，2000. The structure of melittin in membranes. *Biophysical Journal*，50：573 – 582.

Wang GL，Xing Z，2005. Current status and prospect of melittin study. *Journal of Liaoning Normal University*（*Natural Science Edition*），28(1)：87 – 91. [王关林，邢卓，2005. 蜂毒肽的研究与展望. 辽宁师范大学学报(自然科学版)，28(1)：87 – 91]

Xiao L，Wang S，Wang F，2005. Principle and method of application of comet assay in detection of DNA injury in the cell. *Sichuan Journal of Anatomy*，12(1)：40 – 42. [肖琳，王松，王凡，2005. 应用彗星试验检测细胞 DNA 损伤的原理与方法. 四川解剖学杂志，12(1)：40 – 42]

Xu WL，2003. Research progress of Na$^+$-K$^+$-ATPase. *Overseas Medicine*（*Section for Psycology*，*Pathology and Clinical Medicine*），3(5)：531 – 534. [徐文琳，2003. Na$^+$-K$^+$-ATPase 研究进展. 国外医学·生理、病理科学与临床分册，3 (5)：531 – 534]

Zelezetsky I，Tossi A，2006. Alpha-helical antimicrobial peptides – using a sequence template to guide structure-activity relationship studies. *Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes*，1 758（9）：1 436 – 1 449.

Zhang LX，Zhang TF，Li TY，1997. Experimental Methods and Techniques of Biochemistry. 2nd ed. Higer Education Press，Beijing. 11 – 13. [张龙翔，张庭芳，李令媛，1997. 生化实验方法和技术. 第二版. 北京：高等教育出版社. 11 – 13]

Zhao YH，Liu AS，Li RQ，Gao XY，Zhang W，Zheng HP，2007. The research progress in biological mechanism of melittin. *Acta Entomologica Sinica*，50(7)：737 – 744. [赵亚华，刘霭珊，李日清，高向阳，张微，郑慧平，2007. 蜂毒溶血肽作用机理研究进展. 昆虫学报，50(7)：737 – 744]

Zhu WB，Chen HQ，Wang J，Zhao H，Lin XF，Lin F，Zhang HH，2005. Screening neonatal glucose-6-phosphate-dehydrogenase ddeficiency by fluorescent assay. *Laboratory Medicine*，(6)：508 – 510. [朱文斌，陈涵强，王旌，赵红，林秀凤，林枫，张洪华，2005. 应用荧光法筛查葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症. 检验医学，(6)：508 – 510]

（责任编辑：赵利辉）